

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520101153343

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

低氧诱导因子在大鼠角膜新生血管形成中的表达

The expression of Hypoxia-inducible factor in rat corneal neovascularization

李忠叶

指导教师姓名: 陈永雄 教授

专 业 名 称: 药理学

论文提交日期: 2013 年 4 月

论文答辩日期: 2013 年 5 月

2013 年 4 月

低氧诱导因子在大鼠角膜新生血管形成中的表达

李忠叶

指导教师

陈永雄
教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

背景 角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)破坏角膜的透明性,影响视力,严重时甚至致盲。多种病理因素可以导致 CNV 的形成,但是 CNV 的形成机制目前还尚未明确。随着分子生物学的发展,人们对 CNV 的发病机制认识也日趋深入,低氧诱导因子在 CNV 发病机制中的作用也得到重视。研究发现低氧诱导因子(HIF)是各种低氧诱导基因调节的关键转录因子,可以上调多种靶基因的表达,但迄今为止,HIF 参与新生血管形成的机制仍不清楚,角膜中是否表达 HIF 及何种类型细胞表达 HIF 也不清楚。

目的 研究正常和缝线后大鼠角膜低氧诱导因子 1α 和 2α (HIF 1α 、HIF 2α),随新生血管形成的表达变化和表达的细胞类型及与炎症细胞的关系,探讨 HIF 在角膜新生血管形成中可能的作用,为揭示角膜新生血管形成的机制提供依据。

方法 以缝线诱导方法建立大鼠角膜新生血管模型,将 SD 大鼠随机分为正常对照组和 4 个缝线实验组,每组 15 只。对照组不做任何处理,实验组进行角膜缝线诱导新生血管形成。在缝线后第 1、3、5、7 天,观察大鼠 CNV 的生长情况并记录 CNV 的生长面积,并取角膜组织分别进行提取 RNA、蛋白和固定及包埋切片,以实时荧光定量逆转录-聚合酶链式反应 (Real-time RT-PCR)、蛋白质免疫印迹 (Western Blot)、原位杂交(in situ hybridization)和免疫组织化学 (immunohistochemistry)等实验方法,检测 HIF 1α 和 HIF 2α 在大鼠角膜缝线后各时间点的表达和细胞的定位。并通过 RT-PCR 方法克隆大鼠 HIF 1α 和 HIF 2α 的 cDNA,构建大鼠 HIF 1α 和 HIF 2α 的表达载体,以检验能被 HIF 1α 和 HIF 2α 抗体检测的大鼠角膜组织蛋白是否属于 HIF 1α 和 HIF 2α 蛋白。

结果 对照组的角膜透明无血管,实验组在角膜缝线后第 1、3、5、7 天,新生血管逐渐增多增长,面积逐渐增大。正常大鼠角膜的蛋白和 mRNA 中均能检测到 HIF 1α 和 HIF 2α 的表达,HIF 1α 和 HIF 2α 的 mRNA 均表达于角膜组织的各层细胞。大鼠角膜缝线后,HIF 1α 的蛋白表达随角膜新生血管的增多而减少,但对 VEGFa 蛋白的表达没有影响,HIF 1α mRNA 的表达随角膜新生血管的增多先增加后减少,不仅表达在角膜组织的各层细胞,也表达在新生血管的内皮细胞,但不表达在浸润的炎症细胞;HIF 2α 的 mRNA 也表达在角膜组织的各层细胞和新

生血管的内皮细胞，也随角膜新生血管的增多先增加后减少，但其蛋白的表达则没有变化。大鼠 HIF1 α 存在两个亚型 (isoform)，它们的蛋白分子量分别为 84 和 91kDa；HIF2 α 蛋白的分子量则为 96kDa。

结论 正常大鼠角膜均有 HIF1 α 和 HIF2 α 蛋白和 mRNA 的表达。正常角膜可能是处于低氧状态。大鼠角膜 HIF1 α 蛋白的表达不是随着角膜新生血管的增多而增多，暗示 HIF1 α 不是通过其表达的上调直接促进促血管生成因子的转录而参与新生血管的形成，其功能需要进一步的研究。HIF2 α 蛋白的表达不随角膜新生血管的形成而改变，表明 HIF2 α 可能不参与角膜新生血管的形成。

关键词： HIF1 α HIF2 α 角膜 新生血管

Abstract

Background Corneal neovascularization (CNV) can reduce corneal transparency, affect vision, serious will cause blindness. A variety of pathogenic factors can cause CNV formation, but the CNV formation mechanism is still unclear. With the development of molecular biology, people increasingly in-depth understanding of the pathogenesis of CNV, the role of hypoxia-inducible factor (HIF) on the mechanism of CNV also has been received attention. HIF is a key transcription factor of a variety of low oxygen induced gene, but so far, the mechanism of HIF involved in angiogenesis is remain unclear. And whether the corneal express HIF and what type of cells express HIF is also not clear.

Objective In the rat normal cornea and after suture, studies the expression changes of HIF1 α and HIF2 α along with the formation of corneal neovascularization, and their expression of cell types and relations with inflammatory cells, and explore its possible role in corneal neovascularization formed, and provide the basis for revealing mechanism for the formation of corneal neovascularization.

Method Induced by suture method to establish animal model of rat corneal neovascularization, the SD rats were randomly divided into control group and 4 experimental groups, each group of 15 only. Control group without any treatment, the experimental group were corneal sutured to induce the formation of corneal neovascularization. After suture days 1, 3, 5, 7, observed the growth of CNV in rats and recorded the growth of CNV area, and take the corneal tissue for extraction of RNA, proteins, and fixed embedding slice, by real-time fluorescent quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR), protein immunoblot (Western Blot), in situ hybridization(ISH) and immunohistochemistry experiment method, testing the expression of HIF1 α and HIF2 α in rat cornea after suture of point in time, and the expression cellular localization. Cloned the rat HIF1 α and HIF2 α cDNA by RT-PCR, and build the rat HIF1 α and HIF2 α expression vector,

to test HIF1 α and HIF2 α antibody in rat corneal tissue protein is a real HIF1 α and HIF2 α protein.

Results The corneal of control group are transparency without blood vessels, the experimental group with cornea suture, after days 1, 3, 5, 7, the new blood vessels gradually increase and growth, area increase gradually. In the cornea of the normal rats, the protein and mRNA can detect HIF1 α and HIF2 α expression, and HIF1 α and HIF2 α express in layers of the corneal tissue cells. In the rat cornea after suture, HIF1 α protein expression decreased along with the increase of corneal neovascularization, HIF1 α mRNA expression first increases then decreases along with the increase of corneal neovascularization, and HIF1 α mRNA not only express in layers of the corneal tissue cells and neovascular endothelial cells, but not express in inflammatory cells; The HIF2 α mRNA express in layers of the corneal tissue cells and neovascular endothelial cells, and a slight increase along with the increase of corneal neovascularization, but there is no change of its protein expression. With the increase in corneal neovascularization, VEGFa protein expression did not change. Rat HIF1 α exist two isoforms, and their molecular weight are respectively about 84 and 91kDa, the molecular weight of HIF2 α protein is 96kDa.

Conclusion The normal rat corneal both express HIF1 α and HIF2 α protein and mRNA. Normal cornea may be in a hypoxic state. The protein expression of HIF1 α in rat cornea is not increased along with the increase of corneal neovascularization, it imply that HIF1 α not through its upregulation contribute directly to the pro-angiogenic transcription factor involved in angiogenesis, and its function requires further study. There is no change of HIF2 α protein expression along with the increase of corneal neovascularization, which indicate that HIF2 α may not participate in the formation of corneal neovascularization.

Keywords: HIF1 α ; HIF2 α ; corneal; neovascularization

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
Table of Contents	VIII
第一章 前 言	1
1.1 低氧诱导因子简介	1
1.1.1 低氧诱导因子的结构和种类.....	1
1.1.2 低氧诱导因子的靶基因.....	2
1.1.3 低氧对 HIF 的调节	3
1.2 低氧诱导因子与新生血管	3
1.2.1 HIF 与 VEGF.....	3
1.2.2 低氧诱导因子与视网膜和角膜新生血管.....	4
1.3 低氧诱导因子与炎症	5
1.4 研究 HIF 在角膜新生血管形成过程中表达的目的和意义	6
第二章 实验材料与方法	8
2.1 实验材料	8
2.1.1 抗体.....	8
2.1.2 主要实验试剂.....	8
2.1.3 主要实验溶液.....	9
2.1.4 PCR 引物	11
2.1.5 主要实验仪器.....	12
2.2 实验方法	13
2.2.1 角膜组织切片的制备.....	13
2.2.2 角膜组织和培养细胞蛋白的提取.....	14
2.2.2.1 角膜组织蛋白的提取.....	14

2.2.2.1 培养细胞蛋白的提取.....	14
2.2.3 角膜 RNA 的提取.....	14
2.2.4 RT-PCR 反应.....	15
2.2.4.1 逆转录.....	15
2.2.4.2 RT-PCR 反应.....	15
2.2.4.2 qPCR 反应.....	16
2.2.5 全长 HIF1 α 和 HIF2 α cDNA 克隆的制备.....	16
2.2.5.1 PCR 产物的回收和纯化.....	16
2.2.5.2 HIF1 α 和 HIF2 α cDNA 片段的连接.....	17
2.2.5.3 感受态细胞的制备.....	17
2.2.5.4 质粒的转化.....	18
2.2.5.5 质粒的提取和纯化.....	18
2.2.6 大鼠 HIF1 α 和 HIF2 α 重组蛋白表达载体的构建.....	20
4.2.6.1. HIF1 α 和 HIF2 α 全长 cDNA 的克隆.....	20
4.2.6.2. fullHIF1 α 和 fullHIF2 α 基因连接到 pcDNA3.1/V5-HisA 表达载体上..	21
2.2.7 瞬时表达 HIF1 α 和 HIF2 α 重组蛋白细胞系的建立.....	22
2.2.7.1 细胞培养.....	22
3. 细胞计数.....	23
4.细胞冻存.....	23
2.2.7.1 HIF1 α 和 HIF2 α 重组蛋白的瞬时转染.....	23
2.2.8 Westert Blot 免疫印迹分析.....	24
2.2.8.1 BCA 法检测蛋白浓度.....	24
2.2.8.2 Western Blot 免疫印迹分析.....	24
2.2.9 顺序免疫组化和原位杂交.....	25
2.4.1.1 CD146 抗体的免疫组织化学单染和 PMN 及 ED1 抗体的免疫组织化学 双染.....	25
2.4.1.2 HIF1 α 或 HIF2 α mRNA 的原位杂交检测.....	26
第三章 结果.....	28
3.1 HIF1α 和 HIF2α 的表达与角膜新生血管的形成.....	28

3.1.1.大鼠角膜缝线后新生血管的形成过程.....	28
3.1.2. HIF1 α 和 HIF2 α 在大鼠角膜新生血管形成中各时间点的表达	29
3.2 HIF1α 和 HIF2α 在大鼠角膜组织中表达的细胞类型.....	31
3.3 HIF1α 与角膜炎症细胞的关系	33
3.4 大鼠 HIF1α 和 HIF2α 重组蛋白表达载体的构建.....	34
3.4.1 不同公司 HIF1 α 和 HIF2 α 抗体检测角膜蛋白的结果	34
3.4.2 大鼠 HIF1 α 和 HIF2 α 重组蛋白表达载体的构建	35
3.4.2.1. 大鼠 HIF1 α 或 HIF2 α 全长 cDNA 的克隆.....	35
3.4.2.2. HIF1 α 和 HIF2 α 全长 cDNA 的测序鉴定.....	37
3.4.2.3. 大鼠 HIF1 α 和 HIF2 α 重组蛋白表达载体的构建.....	39
3.4.2.4 大鼠 HIF1 α 和 HIF2 α 重组蛋白表达载体的转染和 HIF1 α 和 HIF2 α 抗体效能的鉴定.....	40
第四章 讨论	43
第五章 结论	47
参 考 文 献	48
致 谢.....	54

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Introduction to hypoxia-inducible factor.....	1
1.1.1 The structure and types of hypoxia-inducible factor	1
1.1.2 hypoxia-inducible factor of target genes.....	2
1.1.3 Hypoxia regulation of HIF	3
1.2 Hypoxia-inducible factor and angiogenesis	3
1.2.1 HIF and VEGF	3
1.2.2 HIF and retinal and corneal neovascularization.....	4
1.3 Hypoxia-inducible factor and inflammation	5
1.4 The significance of the study of HIF in corneal neovascularization.....	6
Chapter 2 Materials and methods.....	8
2.1 Materials	8
2.1.1 Antibody.....	8
2.1.2 The main experimental reagents	8
2.1.3 The main experimental solution.....	9
2.1.4 PCR primers.....	11
2.1.5 The main experimental instrument	12
2.2 Methods.....	13
2.2.1 Preparation of corneal tissue slices	13
2.2.2 Extraction of corneal tissue and cultured cells protein	14
2.2.2.1 Extraction of corneal tissue protein.....	14
2.2.2.1 Extraction of cultured cells protein	14
2.2.3 Extraction of corneal tissue RNA	14
2.2.4 RT-PCR	14

2.2.4.1 Reverse transcriptase.....	15
2.2.4.2 RT-PCR	15
2.2.4.2 qPCR	15
2.2.5 The preparation of full-length HIF1 α and HIF2 α cDNA clones.....	16
2.2.5.1 Recovery and purification of PCR products.....	16
2.2.5.2 The connection of the HIF1 α and HIF2 α cDNA fragment.....	17
2.2.5.3 Preparation of competent cells	17
2.2.5.4 Plasmids	18
2.2.5.5 Extraction and purification of the plasmid	18
2.2.6 The construction of the rat HIF1 α and HIF2 α recombinant protein expression vector	20
4.2.6.1. The clone of HIF1 α and HIF2 α full-length cDNA.....	20
4.2.6.2. Connected fullHIF1 α and fullHIF2 α to pcDNA3.1/V5-HisA expression vector.....	21
2.2.7 Establish the cell lines of transient expression the HIF1 α and HIF2 α recombinant protein	22
2.2.7.1 Cell culture.....	22
3. Cell counts.....	22
4. Cryopreservation.....	23
2.2.7.1 Transient expression the HIF1 α and HIF2 α recombinant protein	23
2.2.8 Western Blota nalysis.....	24
2.2.8.1 BCA assay protein concentration	24
2.2.8.2 Western Blot nalysis.....	24
2.2.9 Order immunohistochemistry and in situ hybridization	25
2.2.9.1 Single stain immunohistochemistry CD146 antibody double stain and PMN and ED1 antibody.....	25
2.4.2.2 ISH	26
Chapter 3 Results	28
3.1 HIF1α and HIF2α with corneal neovascularization	28

3.1.1. The corneal neovascularization formation of rat corneal sutures	28
3.1.2. HIF1 α and HIF2 α each time point expression in rat corneal neovascularization.....	29
3.2 HIF1α and HIF2α expressing cells in the rat corneal tissue	30
3.3 HIF1α relationship with the corneal inflammation cells.....	32
3.4 Construction and identification of HIF1α-pcDNA3.1/V5-HisA HIF2α-pcDNA3.1/V5-HisA	33
3.4.1 Different antibodies results	34
3.4.2 Construction of the rat HIF1 α and HIF2 α recombinant protein expression vector	35
3.4.3 The rat HIF1 α and HIF2 α recombinant protein expression vector transfection efficacy identify the HIF1 α and HIF2 α antibody.....	40
Chapter 4 Discuss.....	43
Chapter 5 Conclusion	47
References	48
Acknowledgements	54

第一章 前言

正常角膜透明无血管，是维持其正常生理功能的首要条件。研究认为在病理状态下，如临床上发生缺氧、外伤、化学伤和感染性角膜病变等，毛细血管从角膜缘血管网侵入角膜即形成角膜新生血管（CNV）。角膜新生血管的形成一方面有利于清除感染、促进损伤的修复，但另一方面却导致了角膜透明度不同程度的下降，威胁视力甚至可导致失明，研究其发生机制和能阻止其形成的抑制剂，一直是眼科学的热点和难点^[1]。

新生血管即在原有血管的基础上增生新的血管，其过程一般认为是原有血管的内皮细胞被激活，血管管壁的基底膜受一些酶的作用产生降解，内皮细胞趋化、迁移、增生并与周围细胞相互作用，最后形成管腔。角膜新生血管是一个极其复杂的过程，涉及到多种细胞包括血管内皮细胞、周细胞、血循环中的细胞及基质细胞之间的相互作用，与角膜水肿、缺氧、炎症、角膜缘干细胞缺乏、促血管生成因子与抗血管生成因子之间调节失衡等因素有关，受 Notch、Wnt、MAPK、PI3K/Akt 等多种信号通路的调控^[2-4]，其确切机制尚不清楚。

尽管目前血管内皮生长因子（VEGF）被认为在 CNV 发生机制中起着主要作用^[5]，但即便使用 VEGF 抗体及抑制 VEGF 基因表达的反义核酸技术也只能在一定程度上减轻角膜新生血管的形成^[6]，表明角膜新生血管的生长是受到多种因素的制约。因此，人们尚在寻求其它的可能因素，研究思路也拓宽到多协调因素、多交叉环节，除了基质金属蛋白酶（MMPs）外，其他因素如低氧诱导因子、转化生长因子（如 TGF- β ）、白介素（IL）、一氧化氮（NO）及其受体等的研究也受到重视。

1.1 低氧诱导因子简介

1.1.1 低氧诱导因子的结构和种类

低氧诱导因子（hypoxia-inducible factor, HIF）是广泛存在于人和哺乳动物体内的一种转录因子，可以上调多种靶基因的表达，是细胞在缺氧应答反应中最重要的调节因子。目前发现人类缺氧诱导因子家族有 6 个成员，分别是 HIF1 α 、

HIF1 β 、HIF2 α 、HIF2 β 、HIF3 α 和 HIF3 β ^[7-9]，其中 HIF -1 和 HIF -2 是细胞在缺氧应答反应中最重的调节因子，也是目前研究得比较多的因子。HIF 是一种 DNA 结合蛋白，它是由 α 和 β 两个亚单位组成的异源二聚体，而 α 和 β 亚单位同属 bHLH/PAS 基因家族，其中 α 亚单位的存在形式有三种，分别为 1 α 、2 α 和 3 α 。HIF 的 bHLH 区含有 DNA 结合区和 HLH 原发二聚体界面，PAS 区大约是由 300 氨基酸残基组成，含 PAS-A 和 PAS-B 两个半保守重复区，PAS 区与 HLH 区共同构成继发二聚体界面（见图 1）。除 HIF α 外，HIF β 也可与其他许多 bHLH/PAS 蛋白形成具有转录活性的异源二聚体。HIF1 α 和 HIF2 α 的生物化学性质非常相似，能识别同样的 DNA 结合区域，但它们各自具有各自独特的生物效应。如胚胎发育过程中，HIF1 α 能调节血管生长，HIF2 α 则能调节儿茶酚胺的生成^[10, 11]。

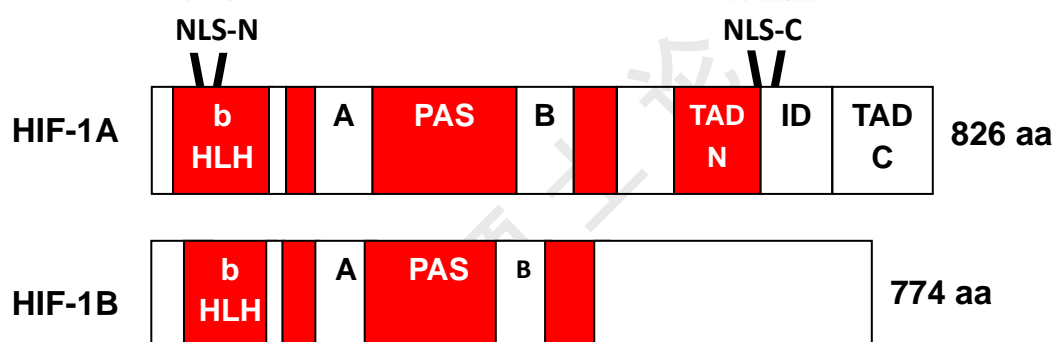


图 1. 低氧诱导因子的基因结构

A: A 重复序列; B: B 重复序列; NLS-N:N 末端核定位信号; NLS-C:C 末端核定位信号; bHLH: 基础螺旋-环-螺旋区; PAS: 含 A、B、NLS-N 和 NLS-C; TAD:转录活性区; ID:转录抑制区。

1.1.2 低氧诱导因子的靶基因

HIF 可调节多种靶基因，目前已经确定的靶基因有超过 70 种^[12]，这些靶基因大致可分为五类：（1）红细胞生成/铁新陈代谢有关的基因：促红细胞生成素（红细胞生成所必需）、铁传递蛋白（运输 Fe³⁺给细胞）、血浆铜蓝蛋白、亚铁氧化酶（将 Fe²⁺转变成 Fe³⁺），主要为红细胞的生长提供必要的生长因子。（2）血管发生相关的基因：一氧化氮合酶-2，血管内皮生长因子（vascular endothelial

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库